

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460474

研究課題名(和文)食道癌局所における浸潤促進因子についての研究

研究課題名(英文)A study for local invasion promoting factor of esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

長沼 誠二(Naganuma, Seiji)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：50452123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌(ESCC)の浸潤先端部においてEMT(上皮間質転換)様の形態変化を示す細胞が存在し、それらがときにEMTのマーカであるZEB1の発現とともにNotch1の核内発現(ICN1)を示すことを明らかにした。この特定のパターンのICN1発現の有無は、ESCC症例の中長期予後と明らかに相関しており、さらに腫瘍の深達度、脈管侵襲、リンパ節および遠隔転移の有無といったfactorとも相関が見られることが明らかになった。このICN1発現は化学・放射線療法後のESCC標本や局所再発病変においてその陽性頻度が有意に増しており、腫瘍の予後不良や転移再発の重要なマーカーとなり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：In invasive fronts of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), there are some tumor cells displaying EMT-like morphology, and they show not only ZEB1, an EMT marker, but also nuclear expression of Notch1 (ICN1). We demonstrated that a specific expression pattern of ICN1 correlates significantly with poorer prognosis of ESCC patients, and also associated with tumor depth, lymphatic and venous invasion, and lymph node and distant metastasis. The positive rate of this ICN1 expression is significantly higher in ESCC samples from patients who have undergone chemoradiation therapy and local recurrence lesions, suggesting that it could be an important marker of bad prognosis, recurrence, and metastasis of ESCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食道扁平上皮癌 浸潤転移 Notchシグナリング EMT

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌は周囲組織に浸潤しやすく、またリンパ節転移も多く全体として予後不良な疾患である。こと食道扁平上皮癌では、その組織分化度に関わらず旺盛な浸潤・転移能を示し、患者の生命予後と組織分化度はあまり相関しないことが知られている。そのため組織レベルでの予後予測因子を見出し、更にはその浸潤・転移のメカニズムを明らかにすることは、食道癌診療において大きな進歩をもたらすと考えられる。

Notch シグナル伝達系は、細胞間の連絡を通じて分化・増殖を制御し、細胞の運命決定に関与する。また腫瘍学の分野でも重要な役割を果たすと考えられているが、その機能は複雑で、ある細胞には癌遺伝子として働き、またある細胞に対しては癌抑制遺伝子として働くというふうに多様な機能を持つ。重層扁平上皮の分化における Notch シグナルの関与については皮膚においてよく研究されており、Notch1 はケラチノサイトの増殖を抑制して最終分化の方向付けを行うのに中心的な役割を果たしており、癌抑制遺伝子として働いていると考えられている。一方、同様に重層扁平上皮を持つ食道における Notch の働きは未だ不明なところが多く、明確なコンセンサスが得られていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

研究代表者らが以前行ったヒト食道癌組織を用いた研究により、正常上皮のみならず扁平上皮癌組織においてもその分化誘導に Notch が関与していることが明らかになり、さらにヒト食道上皮細胞 3 次元培養を用いた研究により、Notch の機能低下は上皮の分化を阻害するのみならず細胞の浸潤性も著しく増強することが明らかになったことから、やはり食道癌においても Notch は癌抑制的に働くと思われた。しかし一方で Notch1 の免疫染色では、食道癌の浸潤先端部において、特に浸潤細胞特有の紡錘形の形態変化すなわち Epithelial-mesenchymal transition (EMT: 上皮間質移行) 様の変化を示す癌細胞の核に Notch1 が染まる事象が少なからず確認された。膜蛋白である Notch1 が核に発現するという事は活性化シグナルが入ったことを示唆しており、癌浸潤部における Notch シグナルの活性化が癌細胞の EMT の引き金となり、その浸潤性を促進している可能性を示唆すると考えた。これは Notch が食道扁平上皮癌において癌抑制遺伝子として働くという見解に矛盾するものであり、この矛盾の解明が、食道癌の浸潤・転移のメカニズムを知るカギになり得ると考え、この現象につき詳細に検討することとした。

### 3. 研究の方法

ヒト原発性食道扁平上皮癌切除標本 215 例、術前放射線・化学療法施行後の食道扁平上皮

癌切除標本 12 例、さらに舌・口腔・咽頭喉頭等の頭頸部扁平上皮癌切除標本 17 例につき、それぞれ HE 染色切片による組織形態評価と、2 種類の抗 Notch1 抗体と抗 ZEB1 抗体で免疫染色を行った。2 つの Notch1 抗体のうち 1 つは Notch1 蛋白の C 末端をエピトープとする抗体(abcam, ab27526)で、もう 1 つは活性化され切離された細胞内ドメイン (intracellular Notch1; ICN1) をエピトープとする抗体(cell signaling, Val 1744)を使用した。それぞれの染色性、特に腫瘍細胞の核における染色性を評価し、核染色のある細胞の局在・配置を基にパターン分類を施し、その後各症例の臨床データ(予後、clinical stage 等)と比較し、それぞれの関連性を統計学的に検討した。

### 4. 研究成果

正常重層扁平上皮において、Notch1 の核染色は主に基底層にみられたが、症例や部位によってその染色性はまちまちであった。しかし上皮内腫瘍 (intraepithelial neoplasia) や上皮内癌 (CIS) 等の dysplastic な上皮においてはその染色性は著明に上昇しており、特に紡錘形又はよりいびつな形態の、脱分化傾向を示す細胞において陽性を示すことが多かった。

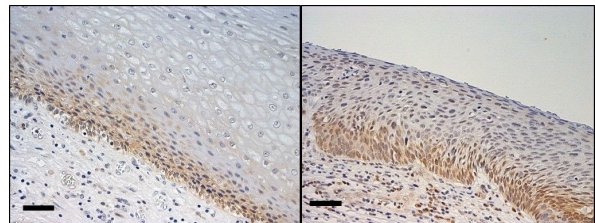


図 1: 正常食道上皮 (左) および高異型度上皮内腫瘍 (右) における Notch1 核染色

浸潤癌においては、Notch1 核染色は大多数の細胞で陰性であり、全く陽性所見の見られない症例も多数みられたが (93/215 例)、陽性を示す場合には主に以下の 3 つの染色パターンに大別されると思われた (図 2)。

1. 主に浸潤先端部で、腫瘍胞巣と間質との境界部または細胞数個以下の小胞巣内の腫瘍細胞、特に脱分化傾向を示す細胞の核染色
2. 表層病変 (dysplasia 等) の基底細胞における染色性に類似した、比較的規則的に配列した紡錘形細胞の、一定領域内での均一な染まり
3. 胞巣の大きさ、形態、局在にかかわらず、腫瘍胞巣内でみられる不規則で patchy な核染色

これら各パターンについて、核染色の有無と症例予後を比較検討したところ、パターン 2, 3 では有意な傾向は見られなかったが、パターン 1 については陽性例の方が陰性例より

有意に中長期予後が不良であるという結果が得られた(図 3)。また、予後のみならず腫瘍深達度(pT), リンパ節転移(pN), 遠隔転移(pM), リンパ管侵襲(ly), 血管侵襲(v)といった factor でも有意差を示した(p<0.05)。

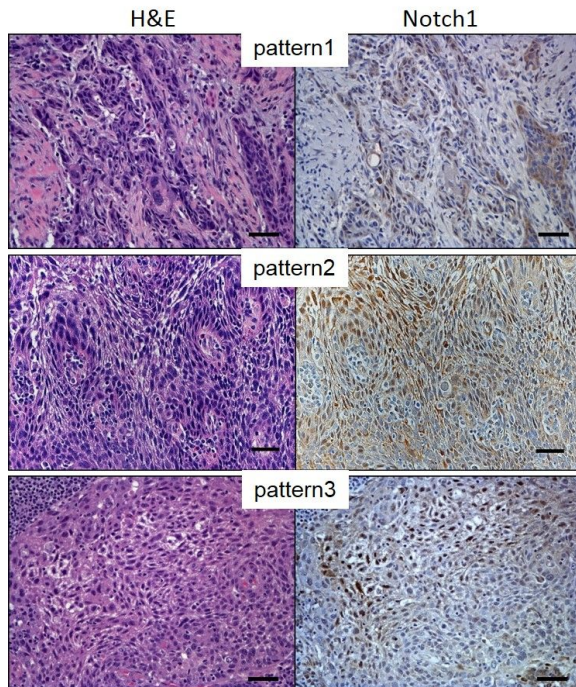


図 2 : Notch1 核染色の 3 パターン例

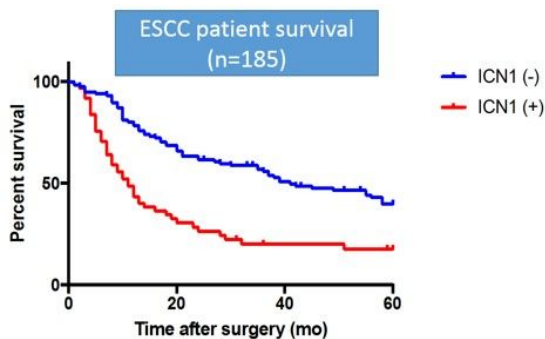


図 3 : パターン 1 核染色の有無による生存曲線(p<0.005)

免疫染色に用いた 2 種類の Notch1 抗体の比較では、ICN1 を選択的に認識する Val1744 抗体の方がよりコントラストの良い核染色を示したが、ab27526 抗体の方でも核染色は十分認識可能であり、両者に大きな違いはなかった。

このような核染色を示す細胞は形態的に紡錘形ないし、よりいびつな形状をとることが多いことは上述したが、Notch1 核染色をみる多くの部で、EMT マーカーである ZEB1 との共発現が確認された(図 4)。これにより、浸潤先端部における Notch1 の活性化が EMT のトリガーとなり、それにより脱分化に傾いた細胞群がより強い浸潤・転移能を示し、予後の悪化に影響したものと考えられた。

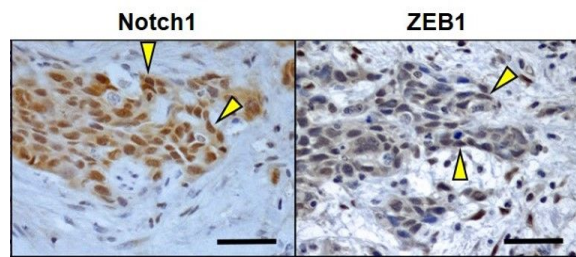


図 4:Notch1 核染色と ZEB1 の共発現

#### まとめ

Notch1 はこれまで、食道扁平上皮癌については腫瘍抑制的に働くと考えられてきた。実際我々が以前行った研究でも、Notch1 は腫瘍細胞の分化誘導に働き、腫瘍細胞の脱分化や浸潤性の獲得とは反対方向の作用をされるとされた。しかし本研究により、進行食道扁平上皮癌および頭頸部癌においても、癌浸潤部の腫瘍胞巣において Notch1 の活性化を示唆する核への発現が見いだされ、そしてこの発現は ZEB1 の発現とも相関が見られることから EMT との関連も深いと思われた。そしてこの活性化は腫瘍の進行性・浸潤性の増強、ひいては予後の悪さとも有意に相関しているため、浸潤局所での Notch1 の活性化が EMT 機転を介して腫瘍の浸潤・転移に寄与していると考えられた。これはこれまでの Notch1 と食道癌の考え方に反するものであるが、これまでの in vitro の実験結果では明らかにならなかった生体内局所での反応であり、今後さらに検討を要する事象と思われた。同時に、この Notch1 の局所での発現の有無は食道扁平上皮癌の予後推定因子となり得ると考え、今後の臨床応用についても模索してゆく。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kagawa S, Natsuzaka M, Whelan KA, Facompre N, Naganuma S, Ohashi S, Kinugasa H, Egloff AM, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Bass AJ, Wong KK, Diehl JA, Rustgi AK, Nakagawa H. Cellular senescence checkpoint function determines differential Notch1-dependent oncogenic and tumor-suppressor activities. *Oncogene*. 34(18):2347-59, 2015. 査読有  
DOI:10.1038/onc.2014.169

〔学会発表〕(計 4 件)

Y. Kita, S. Naganuma, H. Nakagawa, H. Okumura, Y. Uchikado, T. Arigami, K. Sasaki, K. Tanoue, I. Omoto, K. Baba, S. Mori, Y. Uenosono, Y. Mataka, Y. Kijima, K. Mamura, S. Natsugoe. Nuclear Notch1 Expression is Associated with Treatment

Failure and Predicts Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Society of Surgical Oncology 2016 Annual cancer Symposium. March 3-4, Boston, MA, USA

Seiji Naganuma, Hiroshi Itoh, Mutsuo Furihata, Hiroshi Nakagawa: A study of genetic crosstalk with Notch signaling with an organotypic 3D culture model of squamous cell carcinoma. The 33rd Annual Meeting of Japan Human Cell Society, Hotel SKYTOWER Miyazaki, Japan, 2015. 8. 22

〔図書〕(計0件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

長沼 誠二 (NAGANUMA, SEIJI)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部  
門・助教

研究者番号 : 50452123